

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES CON NADP Y NAD EN 6-FOSFOGLUCONATO
DESHIDROGENASA DE ESCHERICHIA COLI MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR DE
LAS FORMAS SILVESTRE Y MUTANTES.**

**HUGO FERNANDO ESCOBAR SEPÚLVEDA
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA**

RESUMEN

La rama oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato, es una de las principales fuentes de producción de NADPH en bacterias heterotróficas. La 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), es la tercera enzima de la rama oxidativa y cataliza la oxidación del 6-fosfogluconato, para formar ribulosa-5-fosfato, a través de la reducción del NAD(P) y la formación de CO₂. En *Escherichia coli* esta enzima es específica por NADP.

El objetivo del proyecto es entender las causas estructurales de la fuerte preferencia de la 6PGDH de *Escherichia coli* (Ec6PGDH) por NADP y proponer mutaciones puntuales de la enzima, que incrementarían la afinidad por NAD y desfavorezcan la interacción por NADP.

A través de simulaciones moleculares, se estudiaron las interacciones de NADP y NAD con Ec6PGDH. En estos sistemas se cuantificaron los puentes de hidrógeno entre la proteína y el cofactor. El análisis de los cambios estructurales (a través del cálculo de la función RMSD) y el cálculo de la energía total del sistema también se realizó sobre estos sistemas

Así mismo se realizó un alineamiento múltiple para caracterizar las relaciones filogenéticas de la familia de la Ec6PGDH, e identificar homólogos lejanos con diferentes especificidades por el cofactor. Por medio del análisis de módulos centrípetos de Ec6PGDH, se identificará el módulo que contiene los residuos responsables de unión a cofactor, y su secuencia será comparada con un homólogo lejano que una a NAD.

Como proyección de los resultados de esta tesis, distintas mutaciones podrán ser usadas en estudios *in vitro*, a fin de encontrar variantes específicas por NAD. Estas mutantes serán relevantes en estudios fisiológicos para alterar el balance de la producción de equivalentes de reducción, como una estrategia de ingeniería metabólica.

ABSTRACT

The oxidative branch of the pentose-phosphate pathway is one of the major sources of NADPH in heterotrophic bacteria. The 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) is the third enzyme of the pathway and catalyzes the reaction of 6-phosphogluconate oxidation to form ribulose-5-phosphate and CO₂ along with NAD(P) reduction. In *Escherichia coli* this enzyme is NADP specific.

The main goal of this work is to understand the structural basis of the strong preference of 6PGDH from *Escherichia coli* (Ec6PGDH) for NADP, allowing the proposition of point enzyme mutations that would increase the NADP affinity, and disfavoring NADP interaction.

Through molecular simulations, we studied the NAD and NADP interactions with Ec6PGDH. In these systems the hydrogen bonds between the protein and the cofactor were quantified. The analysis of the structural changes (according to the RMSD function) and the calculation of total system energy also were performed on these systems

Likewise, a multiple sequence alignment was performed to characterize the phylogenetic relationships of the Ec6PGDH family, and identify distant homologues with different cofactor specificities. By using the centripetal distance function over Ec6PGDH structure, we identified the module that contains the residues responsible in directly binding the cofactor. The sequence of the corresponding modules in 6PGDHs showing different cofactor specificities is compared.

As a future projection of this thesis, the mutations here proposed will be used in the search for NAD-specific variants, by *in vitro* studies. These mutants will be relevant in physiological studies to alter the balance of the production of reducing equivalents, as well as metabolic engineering tool.